

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-87058

⑮ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)4月21日

A 23 J 3/00

7236-4B

審査請求 有 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 新規ペプチド

⑰ 特 願 昭60-226834

⑱ 出 願 昭60(1985)10月14日

⑲ 発 明 者 末 網 邦 男 下関市川中本町16-14  
⑲ 発 明 者 茂 島 克 裕 八幡浜市大字八代222番地の4  
⑲ 出 願 人 茂 島 一 治 福山市水呑町1037番地の8  
⑲ 代 理 人 弁理士 戸田 親男

明 細 書

1. 発明の名称

新規ペプチド

2. 特許請求の範囲

魚介類を蛋白分解酵素で処理し、得られた処理物をアルコール分画し、更にこれをイオン交換樹脂処理して得られた新規ペプチド。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、ペプチドに関するものであるが、更に詳細には本発明は文献未載の新規ペプチドに関するものであり、蛋白質関連技術分野、栄養剤、栄養食品、調味料、医薬といった技術分野、及び水産物の有効利用という面で水産物の技術分野でも広く重用されるものである。

(従来の技術)

魚介肉ペプチドは、魚介類を酸、アルカリ、酵素等で加水分解して得たエキス成分中に含有されるが、これらエキス成分から有用なペプチドのみを大量に且つ精製した状態で抽出、分離する方法

は未だ開発されていない。

ましてや、呈味性にすぐれ、栄養強化にも有用であるのみならず、血圧降下作用のほか数多くの医薬効果をも併有し、しかも後記するような独特の物性、構造を有する本発明に係るペプチドは、文献に記載されておらず全く新規なものである。つまり、本発明に係るペプチドは、物性及び作用効果の両面からして、従来開発されたことがなく全く未知のものである。

(発明の目的)

魚介類、例えば、イワシ、サバ、サンマ、等の不飽和脂肪酸による動脈硬化予防作用が最近注目されている。そこで本発明者等は、魚介類の他の成分にも有用な生理活性物質が存在するのではないかとの着想を得、魚介肉のペプチドに着目した。

そして魚介肉のペプチドには強肝作用のほかにも数多くの生理活性があるのみならず、呈味性、栄養強化性が十分に活用できることの新知見を得、これを確立して工業的に広く有効利用する目的で本発明はなされたものである。

(発明の開示)

上記目的達成のために、本発明者らは大量にかつ高純度のペプチドを製造するため、鋭意研究を行なった結果、魚介類にタンパク分解酵素を作用させることにより、目的とするペプチドを生成させることができ、かつ更にこのペプチドを大量にかつ高純度に単離精製することができるという事実を知見し、本発明を完成したものである。

従って本発明によれば、魚介類をタンパク分解酵素で処理することにより、ペプチドを生成させ、ついでこれをアルコール分画、イオン交換樹脂処理することによって分離、精製することによって目的とするペプチドが得られるのである。

このようにして得られたペプチドは、物性、構造のみならずその作用効果においても独特のものであって文献未載の新規物質であることを確認し、DAN-100と命名した。

本ペプチドは魚介類を原料として製造するものであるが、先ず、これを採肉機、デボナー等によって処理して魚肉質を分離する。原料は出来る

しめ、しかる後に酵素を添加して分解せしめてもよい。

蛋白分解酵素としては、蛋白質を分解し得る酵素であればすべての酵素が単独で又は混合して使用し得る。その起源は、動植物のほか微生物に求めることができ、ペプシン、レニン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、プロメレインのほか、細菌プロテアーゼ、糸状菌プロテアーゼ、放線菌プロテアーゼ等も広く利用できる。これらの酵素は、通常、市販されているものが使用されるが、未精製の酵素、酵素を含有した培養液、菌といった固体又は液体の酵素含有物も、目的により必要に応じて使用することができる。

0.1%濃度のプロテアーゼ液を使用した場合、魚肉としてイワシのような赤身肉を処理するときには、pH4.1、45℃で約17時間、又はpH5.9、48℃で約4時間で酵素処理は終了する。

次いで中和した後、80℃以上の温度に5～30分間保持して酵素を失活させる。加熱失活処理後、バイプロスクリーン等によって濾過し、必要によ

限り新鮮なものが好ましい。分離した魚肉は、10kg程度のすり身に分割し、このまま次の処理に使用してもよいが、-20～-50℃、例えば-30℃程度の冷気を吹き付けて急速凍結し、-20～-25℃に保存しておき、必要に応じてこれを適宜使用するようにしてもよい。

魚介類としては、イワシ、アジ、マグロ、カツオ、サンマ、サバ等赤身魚；ヒラメ、タイ、キス、コノシロ、タラ、ニシン、ブリ等白身魚；サメ、エイ等軟骨魚肉；ワカサギ、コイ、イワナ、ヤマメ等淡水魚肉；アイザメ、アンコウ等深海魚肉のほか、エビ、カニ、タコ、アミ類等も適宜使用できる。

本発明においては、採肉した後、粉砕機等によって魚介肉を粉砕し、加水し、酵素適温（使用酵素によって異なるが、20～60℃程度）にまで加温し、pHも適値（pH3～9程度）に調整し、蛋白分解酵素を加えて、1～30時間処理する。希望するのであれば粉砕魚介肉を加水した後攪拌タンク内で40～60℃程度に1～5時間保持して自己消化せ

りジェクター処理した後、シャープレス遠心分離機等を用いて例えば10,000～30,000rpmで遠心分離する。

これを常法によ濃縮し（30Bx程度にまで）た後、再度遠心分離してペプチド原液を得る。

こうして得たペプチド原液は、精製ペプチド原料として使用するほか、このまま、ないしは濃縮（必要に応じて希釈）して、調味料、栄養剤、健康食品、臨床栄養食、輸液、ドリンク剤等に使用することができる。

次いで、ペプチド原液は、活性炭を加えて攪拌して脱色した後濾過する。濾液にアルコールを加えて放置する。アルコールとしては、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール等が好適であるが、他のアルコールを使用してもさしつかえない。アルコールは冷時使用し（0～10℃）、ペプチド原液と等量ないし30倍以上使用する。冷アルコール添加後、冷室に30分～3時間以上放置して沈殿を生成せしめる。

得られた沈殿は、加水して溶液となし、クロマ

トグラフ処理するのであるが、ペプチド原液の場合と同様に、沈殿物をそのまま前記した各種の用途に使用してもよい。

上記溶液は、イオン交換樹脂で処理するが、樹脂としては、カチオン交換樹脂、特に強酸性カチオン交換樹脂を使用する。例えば、これらの樹脂を充填したカラムに上記溶液を注入し、水洗したあと希アンモニア水等のアルカリ水溶液で溶出し、溶出液を得る。

得られた溶出液は、減圧濃縮等の方法によりアンモニアを除去した後、必要に応じて濃縮して、常法にしたがって凍結乾燥等の方法によって粉末化し、目的とする塩基性ペプチドを得る。前記したように、上記溶出液を、濃縮又は希釈して、各種の用途に使用してもよい。

このようにして得られたペプチドは、文献未知でしかも極めて有用な新規なものであって、DAN-100と命名した。

ペプチドDAN-100の物理化学的性質は次のとおりである。

#### 9. 塩基性、酸性、中性の区別

弱塩基性、pH9.60 (10% 溶液)

#### 10. 物質の色、形状

白色粉末

#### 11. 水分含量

4.01% (常圧乾燥法)

#### 12. 塩分

8.19% (Clとして電位差滴定法により測定)

#### 13. 全窒素及びアミノ酸態窒素

T-N: 16.81% (マイクロケルダール法)

アミノ酸態-N: 2.46% (ホルモール法)

本発明に係るペプチドは、呈味作用のほか、次のような各種の生理活性作用を有している：成長促進作用、血圧降下作用、貧血症予防作用、抗潰瘍作用、強肝作用、更には、糖尿病、肥満症、高脂血症、動脈硬化症等の改善作用。したがって本ペプチドは、調味料、栄養強化用食品といった食品ないしは動物飼料添加剤として使用されるほか、上記した独特の生理活性の故に、各種疾病の予防、ある場合には治療のために、医薬として、または

#### 1. 元素分析値

C: 41.5%, H: 6.7%, N: 16.9%,

O: 34.9%

#### 2. 分子量

セファデックスG-25カラムクロマトグラフィーにより分子量1万以下、500以上と推定される。

#### 3. 融点

173℃

#### 4. 比旋光度

$[\alpha]_D^{20}$  23°

#### 5. UVスペクトル

特異な吸収は認められない。

#### 6. IRスペクトル

図面のとおりに

#### 7. 溶剤に対する溶解性

水、メタノール、DMSO等極性溶媒に可溶であるが、クロロホルム、ヘキサン等非極性溶媒に不溶

#### 8. 呈色反応

ニンヒドリン反応 +

ビウレット反応 +

銅-フォーリン反応 +

フェノール硫酸反応 -

輸液、健康食品、臨床栄養食品等としても市広く使用することができる。

食品として使用する場合には、ペプチドをそのまま添加使用したり、他の食品ないしは食品成分と併用したりして適宜常法にしたがって使用できる。また、医薬として使用する場合には、経口又は非経口投与することができる。経口投与の場合には、例えば常法にしたがい、錠剤、顆粒剤、粉末剤、カプセル剤、散剤とすることができ、又、非経口投与の場合には、例えば注射薬製剤、点滴剤、坐剤等として使用することができる。

本発明に係るペプチドは、天然起原であるために毒性が全くないか又は極めて低く、きわめて安全である (LD<sub>50</sub>: >3,000mg/Kg皮下、>5,000mg/Kg経口: いずれもラット)。

#### 実施例1

新鮮イワシをデボーナーで処理して採肉した。採肉した魚肉質を10kgのすり身に分割した。これを粉碎機で粉碎した後等量の水を加え、45~48℃に加熱し、これを攪拌タンクに移して同温に2~

3時間保持して自己消化分解せしめた。次いでpHを4.1に調節した。

これにデナチーム（市販プロテアーゼ製剤商品名）の0.1%液を加え、45℃に17時間保持して酵素分解を行った。中和し、次いで15分間煮沸して酵素を失活せしめた。

これをバイブロスクリン(150メッシュ)で濾過し、濾液を5000rpmでジェクター処理した後、シャープレス遠心分離機で処理し(15,000rpm)、20 Bx となるまで常温加熱濃縮し、そして再度シャープレス遠心処理(15,000rpm)してペプチド原液(DAN-No2)を得た。

#### 実施例 2

上記で得たペプチド原液(pH 6.22)を1840mlとり、これに活性炭100gを加え60分間攪拌した後濾過して濾液(pH 6.12)1500mlを得た。

濾液を100mlとり、これに冷メタノールを2000ml加え、冷室に60分間放置して沈殿を生ぜしめた。生じた沈殿物に水を加えて溶液(E)を得た。

#### 実施例 3

ペプチドDNA-100を連続経口投与(3-10g/kg体重、3-27日間)した後、断頭し、直ちに開腹して、肝臓の採取を行って、肝湿重量を測定した。肝湿重量は、対照群(普通食のみ)と比較して、各群全てに増殖率3-14% (10頭平均値)の値を得た。

上記結果から明らかなように、本ペプチドは顕著な肝再生作用を示し、強肝剤としてきわめて有用であることが判明した。投与量は、患者の症状、年齢によっても異なるが、0.1-1000mg/kg/dayで1日1-4回投与する。

#### 応用例 4

- |                        |     |
|------------------------|-----|
| (1) 実施例3で得たペプチドDAN-100 | 10g |
| (2) 塩化ナトリウム            | 9g  |
| (3) クロロブタノール           | 5g  |
| (4) 炭酸水素ナトリウム          | 1g  |

全成分を蒸留水1000mlに溶解し、これを500mlの点滴ビン2本に分注し、栄養輸液を得た。

#### 4. 図面の簡単な説明

図面は、本発明に係るペプチドDAN-100のIRスペクトルを図示したものである。

上記溶液(E)を100mlとり、これをダウエックス50W(H+)を充填したカラム( $\phi 5 \times 15$ cm)に注入した。そして、水2000mlを用いて樹脂を水洗し、2N-NH<sub>4</sub>OH 250mlを用いて溶出し、得られた溶出液を常法によりアンモニア除去後凍結乾燥してペプチドDAN-100の白色粉末を得た。

#### 応用例 1

醤油500g、液糖200g、みりん500gに、実施例1で得たペプチド原液DAN-No2を1kg加えて攪拌し、熟成タンク中で5日間熟成せしめた後、殺菌、ビン詰して、風味のすぐれた割醤油調味料を得た。

#### 応用例 2

ビタミンC 20g、グラニュー糖50g、コーンスターチと乳糖の等量混合物30gに、実施例3で得たペプチドDAN-100を50g加えて充分に混合した。混合物を100等分して袋に詰め、1袋1.5gのスティック状栄養健康食品を100袋製造した。

#### 応用例 3

肝臓の54%を切除した体重約200gの雄性ウエスター系ラットを自由摂食摂水下、実施例3で得た

図 面

